

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

PROGRAMA ACADÉMICO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estudio serológico de la infección de llamas (*Lama glama*) por *Sarcocystis aucheniae* (Brumpt, 1913)

TESIS

Para optar el Grado Académico de Bachiller en Ciencias
Biológicas

AUTOR

Julia Esther CASTRO HIDALGO

Lima - Perú

1973

A MIS PADRES: JULIO Y ADELINA

con cariño y eterna gratitud.

A MIS HERMANOS

LUIS, ELISA y SALOME

Para los que generosamente
me brindan su amistad y con-
fianza.

AL DOCTOR CARLOS A. GUERRERO D .
por el legado de sus conocimientos,
su amistad y asesoramiento del presente trabajo.

A LA DOCTORA FRIDA NAQUIRA V.
por su valiosa ayuda y orientación
en la realización de la presente tesis.

MI AGRADECIMIENTO

A la Dra. Juana Coha, por las sugerencias y revisión de la tesis.

A la Dra. Luz Sarmiento por sus oportunos consejos y revisión de la tesis.

Al Doctor César Náquira V., mi inmensa y eterna gratitud tanto por el legado de sus conocimientos, cuanto por su orientación y ejemplo en los otros aspectos de la vida.

A los Doctores Hernando Bazalar, José Alva y Marcelo Rojas, por sus sugerencias y su valiosa colaboración.

Al Instituto Veterinario de Investigación Tropical y Altura IVITA, mi reconocimiento por el auspicio de esta tesis.

Al personal del Laboratorio de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión" de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

INDICE

	Pag.
I.- Introducción	1
II.- Revisión de Literatura	3
III.- Material y Métodos	8
IV.- Resultados	20
V.- Discusión	31
VI.- Sumario y Conclusiones	35
VII.- Referencias Bibliográficas	37



I.- INTRODUCCION

En la explotación de camélidos sudamericanos, se afronta grandes problemas con parasitosis y dentro de ellas la Sarcocystiosis, que es una histoparasitosis, de gran importancia, producida por un protozoo, el Sarcocystis sp. que afecta las fibras musculares estriadas y cardíaca donde forma quistes blancuecinos, alargados cuyo tamaño varía desde 120 micras hasta 1 centímetro de largo (Guerrero et al. 1967). Los quistes grandes se pueden reconocer fácilmente a simple vista y los pequeños pueden ser detectados solo al microscopio, en cortes histológicos, observándose en su interior divisiones en cámaras que corresponden a los tubos de Miescher, en los que se desarrollan y multiplican los esporozoítos.

El parásito se presenta mayormente en el corazón, pared del esófago, diafragma, flancos, pierna, pecho, lomo y que si bien no causa trastornos aparentes a sus hospederos, puede ocasionar desmejoramiento general del animal cuando se produce una infección masiva y lo más importante corresponde a los decomisos de las carcasas, trayendo consigo pérdidas en la economía nacional, ya que las llamas al igual que las alpacas, son beneficiadas y las carcasas comercializadas en forma doméstica, constituyendo una valiosa fuente de proteína animal en la alimentación humana, principalmente en las zonas de mayor crianza de estos camélidos; pero a medida que se intensifiquen los estudios biológicos y de control, se podrá incrementar el consumo de la carcasa a centros de mayor población.

Los pocos estudios inmunológicos realizados sobre Sarcocystis nos ha inducido a tratar de probar algunas técnicas de laboratorio que sean eficaces y sensibles para poder determinar los anticuerpos circulantes en los animales portado

res de la Sarcocystiosis, de esta manera obtendríamos un método de diagnóstico in vivo. Seleccionamos para el Sarcocystis, las técnicas de Aglutinación Directa (Arcay, 1966), Hemaglutinación Indirecta (Knierim, 1966) y Fijación del Complemento (Knierim, 1958), aplicadas por muchos autores para el diagnóstico serológico de la toxoplasmosis, pues el Toxoplasma presenta una aparente semejanza morfológica con el Sarcocystis, ambos géneros pertenecen al Orden Toxoplasmoda. El objetivo era investigar la posibilidad de la aplicación de dichas técnicas al diagnóstico serológico de la infección de llamas (Lama glama) por Sarcocystis aucheniae (Brumpt, 1913) y determinar además la prevalencia del Sarcocystis en las llamas del Departamento de Puno, mediante la necropsia y búsqueda por métodos histológicos.



II.- REVISION DE LITERATURA

La posición sistemática del Sarcocystis, no está completamente dilucidada, a pesar que Miescher (1943), lo describió por primera vez en ratón considerándolo como un esporozoario. Por un tiempo fue considerado como un hongo por Spindler y Zimmerman (1945), quienes reportaron el aislamiento del Aspergillus como organismo del Sarcocystis extraídos de músculos de cerdos, posteriormente Spindler (1947) continúa con las investigaciones y escribe algunas notas sobre la estructura de los quistes del Sarcocystis de patos y carneros para comprobar si se trataba de un protozoario. En 1953, Grasse estudió al Sarcocystis, tomando en cuenta diferentes hospederos en los que encontró características morfológicas que hecha por tierra las afirmaciones de Spindler. Estudios empezados por Herman (1960) en el "Patuxent Wildlife Research Center", en conejos y pájaros, también contradice la teoría de que el Sarcocystis es un hongo.

La posición taxonómica del Sarcocystis según Levine (1961) indica que hay bastante evidencia para sostener que es un protozoario y no un hongo. Wanko et al. (1962), en vista de la evidente semejanza, por estudios de comparación de ultraestructura del Sarcocystis con el Toxoplasma, demostró que el Sarcocystis es un protozoo y no un hongo. Algunos autores lo sitúan como afín al Toxoplasma dada sus numerosas semejanzas morfológicas con este parásito.

Actualmente el género Sarcocystis incluye organismos descritos en el dromedario Sarcocystis cameli (Masson, 1910), en la llama Sarcocystis aucheniae (Brumpt, 1913), en la alpaca (Guerrero et al., 1967) y en muchos animales generalmente mamíferos de todo el mundo, raramente en aves, reptiles y peces. También se describe en el hombre, siendo materia de discusión su exacta naturaleza; es por ello, que se han empezado a realizar estudios a través del microscopio electrónico,

como los realizados por Hennero (1967), que estudia la estructura del Plasmodium, Lankesterella, Eimeria, Toxoplasma y Sarcocystis, demostrando que estos géneros presentan una pared quística constituida por 3 membranas y la presencia del micrópilo, además las clásicas inclusiones citoplásmicas como las mitocondrias, sistemas de Golgi, ergastoplasma y vacuolas.

Senaud y Puytorac (1962), realizaron observaciones complementarias de la ultraestructura de la espora del S. tenella de carneros. También ha sido estudiado el S. miescheriana (Kuhn, 1965) de cerdos por Ludvik (1960) mediante microscopía electrónica.

El 1966, Zeve et al. realizaron estudios microscópicos del Sarcocystis sp. procedentes de garzas silvestres, Simpson (1966) realiza estudios usando secciones de quistes de S. fusiformis estudiados in situ en el miocardio de ganado vacuno.

Wettimuny et al. (1966), reportaron por primera vez la presencia de Sarcosporidiosis en Ceylan, demostrándose histológicamente en los músculos y otros órganos de vacunos y búfalos.

Sahasrabudha et al. (1966) reportaron la presencia de quistes de Sarcocystis en perros encontrados en la musculatura lisa del esófago de un perro procedente de Madhya Pradesh en la India. Estos estudios revelan estructuras diferenciales que pueden usarse para hacer una separación de especies ayudando en esta forma a dar una clara evidencia para la clasificación taxonómica del Sarcocystis.

Actualmente se reportan muchas otras especies las que reciben el nombre según el hospedador que tienen, como Werner (1966), que repor

ta la infección por S. chamaeleonis con cambios patológicos en Chamaeleo fischer en el Este Africano. También trabajos realizados por Brocklesby et al. (1965) demuestran la presencia del Sarcocystis asociado a otros parásitos en animales silvestres del Este de Africa. Se han realizado estudios de infección selectiva por Sarcocystis aislándolos de músculos de ratón blanco por Krueger (1964). En Estados Unidos Lode et al. (1966) realizaron estudios sobre algunas enfermedades y parásitos de la "chochaperdiz" cautiva encontrándose el Sarcocystis en una sola ave.

Kozar (1971), ha realizado el diagnóstico microscópico de la Sarcosporidiosis y su incidencia en algunos animales domésticos de Polonia. Mandour (1970) indica la infección por Sarcocystis en antílopes de Africa. También se han realizado estudios acerca de los cambios anátomo-patológico durante una experiencia para Sarcocystiosis en pollos, por Sominiskii (1971).

En 1966 Kallab, encontró que el 67% de bovinos y el 11% de cerdos, estuvieron parasitados por Sarcocystis, siendo en la gran mayoría animales importados. Empleando esporas obtenidas de diferentes medios de cultivo Mandour (1965), demostró los cambios morfológicos que sufre el Sarcocystis in vitro e in vivo.

Madrzak (1966), estudió la variación en la incidencia de la Sarcosporidiosis en mataderos de cerdos, comprobando que hubo incremento de infección anual de las carcasas. Batistic (1965) realizó estudios de Sarcosporidiosis en animales y en humanos de Bosnia y Hercegovina; para ello utilizó músculos cardíaco, esquelético y otros órganos de humano y 43 especies de animales sometidos a examen microscópico e histológico.

El Afifi et al. (1963) infectó, por vía oral, a ratones blancos con quistes de S. blanchardii de búfalo, observándolos al cabo de tres semanas y comprobándose que se habían parasitado. En 1959 Da-Silva, publica un método rápido para la pesquisa, de Sarcosporidiosis, consistía en efectuar una incisión en el músculo cardíaco y por repetidas veces realizaba raspados superficiales en los bordes de la incisión referida, obteniéndose fragmentos minúsculos de tejido muscular cardíaco los que fueron coloreados con Leishman y Wright. También se realizaron incisiones en las paredes del ventrículo y aurículas y en zonas interauriculares e intraventriculares; encontrándose un porcentaje elevado en el músculo cardíaco de ovinos, cerdos y equinos.

En la actualidad son relativamente escasas las referencias que estudian la serología del Sarcocystis. En la literatura figuran las de Hooker (1957), que aplicó el "dye test" descrito por Sabin-Feldman a sueros de terneros, vacunos adultos y jóvenes y carneros adultos, obteniéndose resultados satisfactorios los que fueron comparados con el examen post-mortem en la musculatura del esófago. Los títulos más altos se obtuvieron en sueros de carneros adultos. Piekarskii (1962) realizó la comparación mediante pruebas serológicas entre los antígenos de Toxoplasma sp. y Sarcocystis sp. en carneros y otros animales de laboratorio usando la técnica de Sabin-Feldman obteniéndose como resultados 198 animales positivos para toxoplasmosis de 217 sueros problema pero cuando se comparó anticuerpos de Toxoplasma y Sarcocystis, comprobó que sólo se encontraban presentes en 26 carneros. La infección de S. tenella en animales de laboratorio por vía oral, demostró la presencia de anticuerpos para fijación del complemento en dichos animales.

También en Inglaterra se han realizado estudios serológicos, como los de Arcay (1966), quién aplicó la prueba de Aglutinación di-

recta, para la determinación de los anticuerpos específicos, usando esporas de Sarcocystis banella destruídas por ultrasonido. Esta prueba fué aplicada por primera vez por Fulton y Turk (1959) usando quistes de Toxoplasma gondii, los que inoculados en ratas dieron como resultados títulos altos.

En 1971 Andrade realiza estudios serológicos para encontrar un antígeno que pueda usarse simultáneamente en la determinación de Toxoplasma, Sarcocystis y Coccidias.

En el Perú, según referencias bibliográficas no se han realizado estudios de prevalencia, distribución geográfica, datos concretos de pérdidas económicas, ni estudios serológicos para Sarcocystiosis en llamas, por ello se pretende en el presente trabajo iniciar el estudio serológico, constituyendo así el primer intento de investigación serológica sobre Sarcocystiosis en camélidos sudamericanos, en este caso en llamas (Lama glama) de la provincia de Puno, en que se prueban técnicas usadas por otros autores para el diagnóstico serológico de la Toxoplasmosis.

Esta parasitosis es motivo de estudio para numerosos investigadores quienes día a día aportan nuevos conocimientos al mundo científico, pero todavía quedan muchas incógnitas por despejar.

El examen histológico fué realizado en el Laboratorio de Patología del Programa Académico de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Las técnicas serológicas se efectuaron en los Laboratorios de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión" de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

III.- MATERIAL Y METODOS

1.- Lugar de Muestreo:

El presente trabajo fué ejecutado en la Provincia de Puno, Departamento de Puno, ubicado entre los 13° y 17° 25' latitud Sur y entre los 68°50' y 71°10' longitud Oeste, a 3,870 metros de altura sobre el nivel del mar. La zona en estudio presentaba una temperatura ambiente que oscilaba entre los 5.8°C 9.5°C de temperatura promedio; la precipitación pluvial anual varía entre los 5 y los 138 mm. en 24 horas y la humedad relativa es baja fluctuando entre el 39 y 59%. (1)

El grupo estudiado estuvo constituido por 131 llamas (Lama glama), beneficiadas para consumo humano en el camal de dicha provincia, proviniendo de diferentes localidades, siendo ellas Pichacani (67 llamas), Laraquierei (19), Paucarcolla (12), Mañazo (6), Carumas (5), Puno (5), Capachica (4), Tiquillaca (3), Chaco (2), Cutte (2), Acora (2) Platería (2) y Chucuito (2); animales cuyas edades calculadas de acuerdo a la dentadura fluctuaban entre los 1.5 años y los 7 años aproximadamente, quedando incluido el mayor número de animales de 1.6 - 2.5 años con 36 animales. La distribución por edad y sexo se encuentra resumida en el Cuadro N° 1.

2.- Examen Macroscópico:

Al realizar el examen macroscópico, previa necropsia, se puso especial cuidado en los órganos de mayor localización de los focos sarcosporídicos como son el esófago, pierna, diafragma y corazón, encontrándose un animal sumamente parasitado. Se aislaron los quistes de la musculatura del cuello y se depositaron en suero fisiológico al 0.85% y en refrigeración hasta su transporte a Lima,

(1) Datos proporcionados en el Laboratorio de Meteriología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

para ser utilizados en la elaboración del antígeno.

3.- Examen Microscópico.-

Las muestras obtenidas del corazón y diafragma fueron colectadas para su fijación en una solución de formol al 10% para su posterior estudio histológico, previa inclusión y coloración con Hematoxilina y Eosina, según la técnica descrita por Lee (1968); tratamiento realizado en el Laboratorio de Patología del Programa Académico de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

4.- Colección de Sueros:-

Paralelamente al examen macroscópico, se colectaron muestras de sangre alrededor de 20 ml, en forma estéril sin anticoagulante y después de procesarlas se guardaron los sueros en congelación -20°C, hasta su transporte a Lima en termos especiales con refrigeración adecuada, para su posterior estudio serológico.

5.- Pruebas Serológicas.-

En el Laboratorio los sueros fueron procesados siguiendo las técnicas de la reacción de Aglutinación Directa Aplicada y modificada por Arcay (1966); la reacción de Hemaglutinación indirecta (RHA) por el micrométodo en placa, modificada y aplicada por Knierim (1966) y la Técnica de Fijación del Complemento (RFC) según la técnica del 50% de hemólisis de Bozicevich, modificada por Knierim (1958). Estas tres técnicas fueron aplicadas utilizando antígeno preparado a base de los quistes. Estas técnicas se efectuaron en los Laboratorios de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión" de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Se usaron 47 sueros controles de título conocido a Sarcocystis sp. para comprobar nuestros procedimientos, estos controles se vere-

ficaron varias veces y se mantuvieron a - 20°C.

Preparación del Antígeno.-

Se siguió la técnica usada por Arcay (1966), con ligeras modificaciones. De una llama altamente parasitada con Sarcocystis se tomó el cuello para la elaboración del antígeno. Luego se procedió a lavar el órgano parasitado en corriente de agua procediendo a extraer después los quistes cuidadosamente de la musculatura estriada, siendo colectados dentro de un recipiente estéril que contenía suero fisiológico al 0.85%. Posteriormente, se realizaron 5 congelaciones y descongelaciones sucesivas a la suspensión de los quistes, para realizar después una liviana molienda en mortero estéril y de ésta manera liberar las esporas. Una vez obtenida una suspensión homogénea se adicionó la siguiente solución Buffer salino pH 7.6:

Na_2HPO_4	0.2 M	87 ml
$\text{Na H}_2\text{PO}_4$	0.2 M	13 ml
H_2O destilada c.s.p.		200 ml

Obteniéndose de esta manera una suspensión concentrada que nos sirvió para preparar el antígeno, guardándose dicha suspensión en refrigeración.

La suspensión de esporas en Buffer salino pH 7.6 se agitó y luego se colocó en centrífuga refrigerada por 15 minutos a 2,000 g. (2) Luego se retiró el sobrenadante y los parásitos del fondo fueron suspendidos nuevamente en buffer y se procedió otra vez a centrifugar. La operación se repitió 3 veces. Después de la última centrifugación

(2) 2,000 g. = 2,650 rpm, radio 24.4 y cabezal 269.

los parásitos que quedaron en el fondo se suspendieron en buffer salino pH 7.6 con formol al 1%. Los sobrenadantes también se guardaron y se mezclaron con la suspensión de buffer salino pH 7.6 con formol al 1%. Luego, tanto el sedimento como el sobrenadante se conservaron en refrigeración y fué necesario agitar las suspensiones antes de usarlas.

§.1. Prueba de Aglutinación Directa con Trofozoítos de Sarcocystis sp. aplicada por Fulton (1965) para Toxoplasmosis. En 1966, Arcay aplicó y modificó la técnica utilizando una suspensión de esporas de Sarcocystis tenella. Nosotros aplicamos la prueba siguiendo la técnica siguiente:

- Los sueros para ser probados se diluyeron seriadamente con un rango de 1:20 hasta 1:10,240
- Se utilizó 0.4 ml. de suspensión formolizada de parásitos para cada tubo, usándose en forma pura y en las diluciones 1:10, 1:20 y 1:40.
- Cada fila de las diluciones se controló con buffer salino pH 7.6 agregando a cada control 0.1 ml.
- Los tubos se agitaron y se colocaron en baño maría a 37°C durante 2 horas, luego se dejaron a 2°C y se examinaron al siguiente día.

Según Fulton y Turk (1959), los patrones de aglutinación para la lectura son:

Negativo	: anillo grueso
+	: anillo delgado difuso en el fondo
++	: sólo en el fondo
+++	: con gránulos y con bordes festoneados.

§.2 Técnicas de la Reacción de Hemaglutinación Indirecta, aplicada al diagnóstico de la Sarcocystiosis. Fue empleada por primera vez para triquinosis (Kagan y Bargai, 1956) y ascaridiasis (Kagan,

1957). Cerisola et al. (1962), pensaron que si la reacción de Hemaglutinación (Jacobs y Linde, 1957; Stavitsky, 1954) ha dado un óptimo rendimiento en el diagnóstico ~~del~~ Toxoplasma e Hidatidosis. (Knierim, 1964); Montaña y Ucros (1965), justificaron el empleo de la Hemaglutinación Indirecta para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas; por ello consideramos que dicha reacción pueda ser de utilidad en el diagnóstico de la Sarcocystiosis, adaptando las innovaciones hechas por Lunde (1965) a la técnica de tanización y sensibilización de los glóbulos rojos, aplicando la técnica siguiente:

5.2.1 Glóbulos rojos de carnero.- Los glóbulos rojos de carnero se extraen en forma estéril y se guardan en partes iguales de solución de Alsever modificada descrita por Bukantz et al. (1946) se mantienen a 4°C y se utilizan entre el tercer y sexto día (Alsever pH 6.1).

5.2.2 Soluciones Buffer de pH 7.2 y 6.4.-

a) Solución Buffer pH 7.2

KH_2PO_4	0.15 M	7 ml
Na_2HPO_4	0.15 M	18 ml
Na Cl	-	2.1 gr.
H_2O destilada c.s.p.		250 ml.

5.2.3 Titulación del Antígeno de Sarcocystis sp. - El antígeno se tituló usando el sobrenadante con solución de Buffer pH 7.6 y formal al 1%; en forma pura y en las diluciones 1:5, 1:10 y 1:20 con sueros positivos y negativos conocidos, diluidos al 1:4 hasta 1:4096. Se obtuvo 1:10 como título del antígeno.

5.2.4 Preparación de los sueros.- Se trabajaron 131 sueros de llamas. Fué necesario inactivar los sueros durante 30 minutos a 56°C,

luego fueron absorbidos los anticuerpos heterófilos del suero problema con glóbulos rojos de carnero previamente lavados en suero fisiológico incubándolos a 37°C durante 30 minutos y se dejaron por lo menos dos horas a 4°C. antes de practicar la prueba. Al término de este tratamiento se centrifugaron durante 10 minutos a 2,000 rpm, obteniéndose el sobrenadante para la reacción. Se empleó como diluyente suero normal humano que debe ser inactivado y absorbido en la misma forma que los sueros problema.

5.2.5 Suspensión de los glóbulos rojos.-

- a) Los glóbulos rojos de carnero se lavan tres veces con suero fisiológico.
- b) Se hace una suspensión de los glóbulos rojos (sedimento), aproximadamente 2.8% en solución buffer pH 7.2

5.2.6 Standarización de los glóbulos rojos.-

Se tomó 1 ml. de la suspensión de glóbulos rojos en solución de Buffer pH 7.2 y se agregó 5 ml de agua destilada. La coloración se mide en fotocolorímetro de Klett con filtro verde N° 54. La lectura de 300 da la concentración deseada. Este valor se eligió arbitrariamente, en caso de no obtenerse este valor se aplicó el siguiente cálculo:

$$\begin{array}{rcl} \text{Concentración} & \text{Densidad óptica X Vol. de suspensión} & \\ \text{deseada} & \frac{\text{Densidad óptica requerida 300}}{\text{Densidad óptica requerida 300}} & \end{array}$$

La diferencia entre el volumen inicial y el volumen que da el cálculo indica la cantidad de solución buffer pH 7.2 que debe agregarse o sustraerse para obtener la concentración deseada.

5.2.7 Tanización de la suspensión de glóbulos rojos.-

- a) Se preparó una solución stock de ácido tánico al 1:100 en

suero fisiológico. A partir de esta solución se preparó una dilución al 1: 80,000 en suero fisiológico.

Se mezclaron volúmenes iguales de suspensión de glóbulos rojos en buffer pH 7.2 y solución de ácido tánico 1:80,000, colocándose luego en baño maría de 37°C durante 10 minutos.

b) Se centrifugó por 7 a 8 minutos a 2,000 rpm descartando el sobrenadante. El sedimento se suspendió en el doble de su volumen con buffer pH 7.2.

c) Se centrifugó nuevamente por 7 a 8 minutos a 2,000 rpm. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en el mismo volumen original con suero fisiológico. Esta suspensión puede durar hasta 3 días.

5.2.8 Sensibilización de la suspensión de glóbulos rojos tanizados.-

Los glóbulos rojos tanizados se sensibilizan con el antígeno de Sarcocystis aucheniae, previamente titulado, en el siguiente orden:

Tubo N° 1

Antígeno diluido en buffer pH 6.4 5 ml.

Suspensión de glóbulos rojos tanizados 5 ml.

Tubo N° 2 (control)

Buffer pH 6.4 5 ml.

Suspensión de glóbulos rojos tanizados 5 ml.

a) La sensibilización se realizó, en el caso de Sarcocystis, por, 20 minutos a 37°C; con el tubo control se procedió en la misma forma. Después se centrifugaron ambos durante 7 minutos a 2,000 rpm.

b) Se eliminaron los sobrenadantes de los tubos N° 1 y N° 2, lavándose los sedimentos con un volumen doble de suero normal humano diluido al 1:100 en suero fisiológico.

- c) Se centrifugaron los tubos 1 y 2 durante 7 minutos a 2,000 rpm descartando los sobrenadantes. Los sedimentos se suspendieron en el mismo volumen de suero normal diluido 1:100. La suspensión final del tubo N° 1 contuvo glóbulos rojos sensibilizados y la suspensión del tubo N° 2 sirvió para el control de la absorción previa de los anticuerpos heterófilos de los sueros problema.

5.2.9 Aplicación de la RHA Indirecta en placas por el micrométodo (3)

Se diluyó el suero problema utilizando como diluyente la gelatina 0.3% en suero fisiológico, empezando con la dilución al 1:4. A partir de la primera dilución del suero se hace en tubo, del suero diluido al 0.4 ml por tubo, se hicieron diluciones dobles del 1:4 al 1:4096; con S. negativo al 1:100, luego a cada excavación de suero diluido se agregó 0.05 ml. de suspensión de glóbulos rojos tanizados y sensibilizados con antígenos de Sarcocystis sp.

Control de la suspensión de glóbulos rojos tanizados, se colocó 0.4 ml de suero normal humano diluido al 1:50 y se agregó 0.05 ml de la mezcla de buffer pH 6.4 en vez del antígeno diluido y la suspensión de glóbulos rojos tanizados.

Control de la suspensión de glóbulos rojos tanizados sensibilizados con Sarcocystis sp. En la excavación se colocó, 0.4 ml de suero normal diluido al 1:50 y se agregó 0.05 ml de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados con antígeno diluido en buffer pH 6.4. De cada suero, se preparó la primera dilución o sea 1:4 en un volumen de 0.4 ml y se agregó 0.05 ml de la suspensión de glóbulos rojos tanizados. Este control sirve para ver si se han absorbido los anticuerpos heterófilos del suero problema. Se usó siempre un suero humano positivo de título conocido a Sarcocystis y un suero humano negativo a Sarcocystis; se agitaron suavemente las placas y se dejaron sedi-

(3) "Microtitration Kit", producido por Flow Laboratories Inc.

mentar los hematíes a temperatura ambiente. La lectura se efectuó a las dos horas y 24 horas. La reacción es de 4 cruces cuando presenta una capa difusa que abarca todo el fondo de la excavación con o sin bordes irregulares. La reacción es negativa cuando se forma un sedimento compacto de glóbulos rojos o un anillo en el centro de la celda.

5.3 Técnica de la reacción de Fijación del complemento.- Reacción que fué introducida en 1913 por Guerreiro y Machado para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. En 1946 Bozicevich introdujo el método del 50% de hemólisis en la prueba de fijación del complemento para las enfermedades parasitarias.

Posteriormente Knierim en 1958 utilizó la técnica del 50% de hemólisis de Bozicevich aplicándola al diagnóstico de la enfermedad de Chagas, modificando la lectura de los resultados finales y la standarización de la suspensión de los glóbulos rojos de carnero. Esta técnica, actualmente aplicada al diagnóstico serológico de la Toxoplasmosis con una lectura final del 50% de hemólisis, nos indujo a aplicar al estudio serológico de la Sarcocystiosis, por tratarse de un parásito que guarda cierta semejanza con el Toxoplasma.

5.3.1 Titulación del antígeno de Sarcocystis sp.

El antígeno se tituló usando diferentes diluciones, partiendo de la dilución 1:4 hasta la dilución 1:32 en presencia de un suero conocido positivo a Sarcocystis de título 1:4096, diluido desde la dilución 1:5 hasta la dilución 1:40. El suero negativo humano a Sarcocystis conocido, se empleó en la dilución 1:5. Se realizaron reacciones controles para determinar el poder anticomplementario de las diferentes diluciones del suero y del antígeno. Obteniéndose como título del antígeno 1:32.

5.3.2 Sueros problema.- Se usaron 131 sueros de llamas, los que se inactivaron durante 30 minutos a 56°C en baño maría, siendo diluídos 1:5 para la reacción.

5.3.3 Hemolisisna.- La hemolisisna fué adquirida de la American Hospital Supply Corporation, alcanzando el título de 1:5,000.

Para titular la hemolisisna, se preparó diluciones desde 1:1000 hasta 1:10000, luego se mezclaron volúmenes iguales de estas diluciones con un volumen igual de suspensión de glóbulos rojos. El complemento se usó en la dilución 1:100. Se realizó una distribución en 10 tubos de suero fisiológico, complemento 1:100 y glóbulos rojos sensibilizados, colocándolos luego en baño maría a 37°C por 30 minutos.

Se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 minutos, procediéndose a leer los resultados.

La dilución óptica de hemolisisna es aquella que aunque se aumente la concentración de hemolisisna, no hace variar sensiblemente la cantidad de complemento requerida para el 50% de hemólisis.

5.3.4 Glóbulos rojos de carnero.- Se obtuvo de la misma forma que para la RHA.

5.3.5 Complemento.- El complemento se obtuvo sangrando a un cobayo en un volumen de 5 cm., luego se dejó separar el suero para su centrifugación por 8 minutos a 2,000 rpm.

El complemento se diluyó 1:100 en suero fisiológico para su titulación. Para titular el complemento se procedió en la misma forma que se empleo para titular la hemolisisna, teniendo en cuenta que la sensibilización de los glóbulos rojos se hacen con la dilución óptima de hemolisisna obtenida anteriormente.

5.3.6 Solución Standard de Hemoglobina.- Se preparó centrifugando

10 ml. de la suspensión de glóbulos rojos al 2.8 % en un tubo de centrífuga graduado por 10 minutos a 2,000 rpm. Se obtuvo el sobrenadante agregándole agua destilada hasta completar 9.5 ml. Se agitó fuerte para hemolizar completamente los glóbulos rojos y se agregó 0.5 ml. de solución buffer pH 7.0

Para trabajar siempre con una suspensión de glóbulos rojos de igual concentración se procedió a determinar la densidad óptica de la suspensión en un fotolorímetro de Klett Sumerson, con filtro 56 del sobrenadante de la siguiente mezcla:

0.6 ml de suspensión de glóbulos rojos al 2.8 %
0.6 ml de solución standard de hemoglobina
4.8 ml de suero fisiológico

seguidamente se obtuvo el valor promedio de la lectura de los tubos y la diferencia entre el volumen exacto y el volumen inicial nos indicará la cantidad de suero fisiológico que se debe agregar o sustraer a la suspensión de glóbulos rojos al 2.8 %. La densidad óptica requerida es de 160.

5.3.7 Aplicación de la Prueba de Fijación del Complemento.— La reacción de FC, se practicó examinando los sueros en la dilución 1:10. El antígeno se utilizó en la dilución 1:32. Se usaron 10 tubos y se distribuyeron 0.2 ml. de suero problema a los tubos 1, 2, 3 y 4 de igual manera 0.2 ml. de antígeno a los tubos 1, 5, 6 y 7 ; además 0.2 ml de complemento con 4 unidades a los tubos 1, 2, 5 y 8; con 3 unidades a los tubos 3, 6 y 9 y con 2 unidades a los tubos 4, 7 y 10.

Fue necesario contar siempre con sueros negativos y positivos conocidos, con un control de poder lítico del antígeno y otro para el control del sistema hemolítico. Una vez que fueron distribuidos los reactivos, los tubos se colocaron en refrigeración durante toda la noche, al cabo de las cuales se agregó a cada tubo 0.4 ml de glóbulos rojos sensibilizados y se incubó a 37° C por

30 minutos.

5.3.8 Lectura de la RFC..- Teniendo en cuenta el 50 % de hemólisis la lectura se realiza de la siguiente manera:

0 - 20 % de hemólisis corresponde a POSITIVO INTENSO

30 - 50 % de hemólisis corresponde a POSITIVO DEBIL

60 - 70 % de hemólisis corresponde a SOSPECHOSOS

80 -100 % de hemólisis corresponde a NEGATIVO

La lectura se realiza comparando los tubos con la escala colorimétrica previamente preparada.

Las reacciones se informan si los tubos controles (2- 10) son negativos, es decir que el suero y el antígeno no deben presentar ningún poder anticomplementario y las diluciones del complemento tienen que tener un buen poder lítico.

El tubo N° 1, corresponde a la reacción propiamente dicha, los demás tubos son controles: tubos N° 2, 3 y 4 representan controles que determinan el poder anticomplementario del suero por examinar, en presencia de 4, 3 y 2 unidades de complemento respectivamente. Los tubos N° 8, 9 y 10 controlan si las diluciones del complemento que contienen 4, 3 y 2 unidades del mismo respectivamente, son capaces de lisis los glóbulos rojos sensibilizados.

5.4 Cortes Histológicos..- Para realizar el estudio histológico, se empleó la técnica de coloración de Hematoxilina - Eosina, descrita por Lee y Luna (1968).



IV -. RESULTADOS

El examen serológico de 131 sueros de llamas, estudiados mediante las reacciones de Aglutinación Directa, Fijación del Complemento y Hemaglutinación Indirecta, arrojaron los siguientes resultados: Se observaron reacciones positivas en 130 sueros que corresponde al 99.2 % con la prueba de Hemaglutinación Indirecta. La distribución de frecuencias de títulos obtenidos así como los porcentajes alcanzados por cada dilución se muestran en el Cuadro N° 2, donde se observa que el título mínimo corresponde a la dilución 1:32 y el máximo en la última dilución 1:4096, que corresponde a títulos de 1:4096 (25 casos: 19 %), 1:256 (23 casos: 17.6 %) y 1:128 (20 casos: 16.79 %). De los 130 sueros positivos con RHA indirecta se obtuvo el 9.15 % (13) de sueros que presentaron títulos de 1:64 o menos y el 90.05 % (117) arrojó títulos comprendidos en las diluciones desde 1:128 hasta 1:4096.

Con la prueba de Fijación del Complemento se obtuvieron 26 sueros negativos que resultaron positivos con la RHA, siéndolo a títulos variables; sólo 17 sueros fueron positivos, los que comparados con los resultados de la Hemaglutinación se notó que había concordancia, ya que mientras más intensa era la RFC había títulos más altos con la RHA. En el Cuadro N° 3 se muestran los resultados de la RFC, encontrando que de los 83 sueros que presentaban poder anticomplementario todos ellos fueron positivos a la prueba de Hemaglutinación indirecta. La RFC nos dió resultados comprendidos entre el 0 % de hemólisis y el 40 %, obteniéndose 12 sueros que resultaron con 0 % de hemólisis que corresponde a positivo intenso. No se detectó ningún suero sospechoso.

Los resultados del Cuadro N° 4 indican la procedencia de los casos positivos a Sarcocystis, así como la sensibilidad de los sueros a una y a ambas reacciones serológicas en estudio. La diferencia entre el porcentaje de positividad usando ambas técnicas, reveló una gran diferencia obteniéndose el 99.2 % de positividad a favor de la RHA indirecta.

En el Cuadro N° 5, se muestran los resultados de la RHA in directa y los de la RFC, teniendo en cuenta los diferentes títulos alcanzados de acuerdo a la prueba serológica y los intervalos de edad, encontrando con la RHA 86.2 % de sueros positivos que habían sido negativos y anticomplementarios respectivamente con la RFC. Se observó que el 100 % (51) de animales de 1.5 - 3 años de edad resultaron positivos a títulos que van desde 1:64 a 1:4096; siguieron en positividad en un 100 % los animales comprendidos entre los 4.5 - 6 años de edad. En el intervalo de edad de 0 - 1.5 años de los tres sueros positivos, uno alcanzó el título 1:256 y el otro el título mínimo 1:32.

Los resultados serológicos de la RFC también se muestran en el Cuadro N° 5, en el que pueden observarse que de los 131 sueros de llamas estudiadas, solo 17 dieron reacción positiva, encontrándose que el mayor número de animales que corresponde al 15.5% está comprendido entre los 1.5 y los 6 años de edad; le siguen los comprendidos entre los 1.5 y los 3 años de edad, con 5 sueros positivos. Entre las edades de 1.5 a 3 años se obtuvo el mayor número de sueros anticomplementarios (31) que corresponde a un 37.3 %. El porcentaje de estos resultados se encuentran expresados en el Cuadro N° 6.

Realizando un estudio comparativo entre los resultados de las pruebas serológicas y los exámenes histológicos como se consigna en el Cuadro N° 7, se demostró que existe una correlación directa de mayores casos de positividad que corresponde a un 94.6 % (123) entre las pruebas de Hemaglutinación Indirecta y la presencia del parásito; en la que solamente 7 animales con un porcentaje de 5.34 % presentó títulos positivos a la RHA, siendo negativos a la observación histológica. En cambio, 26 sueros negativos a la RFC de los 31 sueros negativos tuvieron histología positiva y los 5 restantes resultaron negativos a ambas pruebas. Por otro lado, siguiendo la comparación entre la RFC y el estudio histológico, de

83 sueros anticomplementarios, 81 de ellos fueron de histología positiva y solo 2 resultaron negativos.

Al realizar el examen microscópico e histológico se encontró que los quistes del corazón solo fueron visibles microscópicamente alcanzando el porcentaje de 98.47 %; el examen microscópico del diafragma nos dió el 90.08 % de positividad, mientras que el examen macroscópico arrojó el 98.47 % de positividad en el esófago y en la pierna. Del estudio microscópico y macroscópico de órganos parasitados con Sarcocystis, se ha confeccionado el Cuadro N° 8.

No se observó ninguna diferencia por sexo en la distribución de los títulos de la Hemaglutinación Indirecta.

No se obtuvo ningún resultado al aplicar la prueba de Aglutinación Directa, porque no se llegó a preparar el suero inmune en animales de laboratorio.

CUADRO 1

DISTRIBUCION POR EDAD Y SEXO DE LLAMAS QUE PROVEYERON SUEROS
DE LA PROVINCIA DE PUNO

GRUPOS DE EDAD (años)	NUMERO Y PORCENTAJE DE DE LLAMAS EN CADA GRUPO DE EDAD		PORCENTAJE DE MACHOS Y HEM - BRAS EN CADA GRUPO DE EDAD			
	N°	%	MACHOS		HEMBRAS	
			N°	%	N°	%
0 - 1.5	4	3.07	2	1.52	2	1.53
1.6 - 2.5	36	27.48	33	25.17	3	2.32
2.6 - 3.5	16	12.21	14	10.67	2	1.53
3.6 - 4.5	28	21.37	23	17.54	5	3.83
4.6 - 5.5	34	25.95	32	24.43	2	1.53
5.6 - 6.5	12	9.16	5	3.81	7	5.36
6.6 - 7.5	1	0.76	1	0.76	-	-
T O T A L	131	100	110	83.9	21	16.1

CUADRO 2

FRECUENCIAS DE TITULOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION INDIRECTA CON SUEROS DE LLAMAS PROCEDENTES DE LA PROVINCIA DE PUNO, USANDO ANTIGENO PREPARADO DE Sarcocystis aucheniae.

TITULOS	N° DE SUEROS POSITIVOS	PORCENTAJE
1:32	1	0.76
1:64	12	8.39
1:128	20	16.79
1:256	23	17.63
1:512	16	12.24
1:1024	19	13.74
1:2048	14	10.68
1:4096	25	19.00
T O T A L	130	99.2

CUADRO 3

RESULTADOS DE LA REACCION DE FIJACION DEL COMPLEMENTO SEGUN EL METODO DEL 50 % DE HEMOLISIS PARA Sarcocystis auchenize, EN 131 SUEROS DE LLAMAS PROCEDENTES DE LA PROVINCIA DE PUNO.

POSITIVOS		NEGATIVOS		ANTICOMPLEMENTARIOS	
Nº	%	Nº	%	Nº	%
17	12.97	31	23.66	83	63.37

CUADRO 4

PROCEDENCIA DE LOS CASOS POSITIVOS A SARCOCYSTIS Y SENSIBILIDAD DE
SUEROS A RHA, RFC O A AMBAS REACCIONES

DISTRITOS DEL DPTO. DE PUNO	NUMERO DE SUEROS DE CADA DIS- TRITO.	PORCENTAJE DE SUEROS CON TITULOS POSITIVOS A RHA Y RFC CON ANTIGENO DE SARCOCYSTIS					
		POSITIVOS A RHA		POSITIVOS A RFC		POSITIVOS A RHA RFC	
		N°	%	N°	%	N°	%
Acora	2	2	1.52	1	0.76	1	0.76
Carumas	5	5	3.82	1	0.76	1	0.76
Capachica	4	4	3.05	2	1.53	2	1.53
Cutte	2	2	1.52	-	—	-	—
Chaco	2	2	1.52	1	0.76	1	0.76
Chucuito	2	2	1.52	-	—	-	—
Laraquiere	19	19	14.50	2	1.53	2	1.53
Mafazo	6	6	4.58	-	—	-	—
Paucarcolla	12	12	9.16	1	0.76	1	0.76
Pichacani	67	67	51.14	6	4.59	6	4.59
Puno	5	5	3.82	-	—	-	—
Platería	2	1	0.76	1	0.76	1	0.76
Tiquillaca	3	3	2.29	2	1.52	2	1.52
T O T A L	131	130	92.2	17	12.97	17	12.97

CUADRO 5

CORRELACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LAS REACCIONES DE HEMAGLUTINACION
INDIRECTA Y DE FIJACION DEL COMPLEMENTO 50 % DE HEMOLISIS PARA EL DIAGNOSTICO
DE LA SARCOCYSTIOSIS EN LLAMAS, EN FUNCION DE LA EDAD Y EL TITULO.

EDAD (años)	Nº DE ANIMA LES	HEMAGLUTINACION INDIRECTA										FIJACION DEL COMPLEMENTO					
		1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	Neg.	0%	10%	20%	40%	Ac.	Neg.	
0 - 1.5	4	1	1	-	1	-	-	-	-	1	1	-	1	-	1	1	
1.5 - 3.0	51	-	8	11	9	7	7	4	5	-	4	-	1	-	31	15	
3.0 - 4.5	28	-	3	4	1	3	4	6	8	-	3	-	-	-	19	6	
4.5 - 6.0	45	-	-	4	12	6	8	2	12	-	4	2	-	1	29	9	
6.0 - 7.5	3	-	-	1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	3	-	
T O T A L	131	1	12	20	23	16	19	14	25	1	12	2	2	1	83	31	

CUADRO 6

PORCENTAJE DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LA RHA INDIRECTA Y LA
RFC PARA EL DIAGNOSTICO DE LA SARCOCYSTIOSIS EN LLAMAS EN FUNCION
DE LA EDAD.

EDAD (años)	N° DE ANIMALES	RHA				RFC			
		Pos. %		Neg. %		Pos. %		Neg. %	
0 - 1.5	4	3	75	1	25	2	50	1	25
1.5 - 3.0	51	51	100	-	-	5	9.8	15	29.4
3.0 - 4.5	28	28	100	-	-	3	10.7	6	21.4
4.5 - 6.0	45	45	100	-	-	7	15.5	9	20
6.0 - 7.5	3	3	100	-	-	-	-	-	-
TOTAL	131	130		1		17		31	

CUADRO 7

CORRELACION DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE DIAGNOSTICO SEROLOGICO E HISTOLOGICO EN 131 LLAMAS PROCEDENTES DE LA PROVINCIA DE PUNO.

HISTOLOGIA	HEMAGLUTINACION									INDIRECTA						ELIJACION DEL COMPLEMENTO					
	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	Neg.	0%	10%	20%	40%	Neg	Ac.						
POSITIVA	1	12	19	20	15	19	14	24	-	12	2	2	1	26	81						
NEGATIVA	-	-	1	3	1	-	-	1	-	-	-	-	-	5	2						

CUADRO 8

PREVALENCIA DE Sarcocystis aucheniae POR ORGANO PARASITADO AL
EXAMEN MACROSCOPICO Y MICROSCOPICO EN 131 LLAMAS PROCEDENTES
DE LA PROVINCIA DE PUNO

EXAMEN	CORAZON		DIAFRAGMA		ESOFAGO		PIERNA	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
MACROSCOPICO	0	0	97	74	129	98.4	129	98.4
MICROSCOPICO	129	98.4	118	90.1	—	—	—	—



V.- DISCUSION

Con el mejoramiento de técnicas en la elaboración de antígeno de Sarcocystis sp. y modificaciones en la aplicación de los métodos serológicos tales como la prueba de Fijación del Complemento, la de Hemaglutinación Indirecta y Aglutinación Directa; en el presente trabajo se ha tratado de encontrar un método más adecuado para el diagnóstico indirecto de la presencia de Sarcocystis aucheniae en Lama glama, in vivo, mediante el hallazgo de anticuerpos circulantes ya que hasta el momento debido a la ausencia de síntomas, la infección por Sarcocystis pasa desapercibido y se logra solo en el examen post-mortem.

Hemos aplicado la RHA indirecta con las modificaciones de Knierim y Saavedra (1966) y con las innovaciones de Lande (1965) en la tanización y sensibilización de los glóbulos rojos de camero; además se ha reemplazado el método en tubos por el micrométodo en placas plásticas, obteniéndose títulos que fluctúan entre 1:32 a 1:4096 que corresponde al 99.2% (cuadro N°2), de los cuales el mayor número de sueros positivos recayó en la mayor dilución del suero 1:4096 que significa el 1%.

En cuanto a la prueba de Fijación del Complemento, el hecho de que en el Cuadro N° 3, se indique que los resultados positivos fueron apenas del 12.9%, 6% con carácter de anticomplementarios y 23.6% negativos de los 131 sueros estudiados, parece indicarnos que este método de diagnóstico no sería el más adecuado.

Por los resultados consignados en los Cuadros N°2 y 3 referentes a las pruebas de Hemaglutinación Indirecta y Fijación del Complemento respectivamente es evidente que existe una marcada positividad de ~~sasos~~ a la primera respecto de la segunda.

Si estos mismos resultados se analizan más detalladamente en función de los títulos positivos para ambas pruebas serológicas relacionándolo con la edad y número de animales estudiados vemos que apenas 1 solo animal mostró el título más bajo para la Hemaglutinación Indirecta (1:32). Cuadros N° 5 y 6. Nuestros resultados no pueden compararse con otros trabajos similares, pues hasta donde se conoce no se han realizado estudios serológicos para Sarcocystiosis en camélidos sudamericanos.

Arcay (1966), estudió la presencia de Sarcocystis tenella en ovinos, mediante la prueba de aglutinación directa y demostró la correlación entre la presencia del parásito mediante estudios histológicos y la presencia de anticuerpos, mediante la prueba antes mencionada. Si bien no hemos podido hallar esta correlación antes indicada puesto que la Aglutinación Directa no dió resultados, en cambio si podemos comparar nuestros hallazgos de correlación considerando los resultados entre la RHA indirecta y los exámenes histológicos así de 131 sueros estudiados 94% (123) revelaron esta elevada correlación.

De acuerdo al Cuadro N°5 parece ser que la edad no guarda correlación con los resultados de los diversos títulos en la prueba de hemaglutinación indirecta, así vemos que entre las edades de 1.5 a 3 años, 51 animales fueron positivos al título 1:2048 y 45 animales de 4.5, a 6 años apenas 2 resultaron positivos con este mismo título. No podemos decir lo mismo con respecto a la relación entre los resultados obtenidos con la RFC y el examen histológico respectivo dado el alto porcentaje de sueros anticomplementarios encontrados 63 %. No obstante Awad (1954), demostró que la prueba de fijación del complemento es altamente específica para la Sarcocystiosis.

En otros países se han realizado solamente estudios histológicos en diversas comunidades animales, la mayoría de los cuales fueron realizados en cerdos; así Rybaltovskii (1960) en

una encuesta estacional de sarcosporidiosis en cerdos sacrificados para consumo encontró que el 17.8% de las carcasas estaban parasitadas en los meses de Diciembre a Febrero, bajando esta incidencia a 3.4% en el mes de Julio. En nuestro estudio no se han tomado en cuenta estos factores estacionales.

Mc Manus (1963) de 200 cerdos examinados encuentra que 120 estaban infectados con Sarcocystis calcificados, encontrándose localizados en los músculos abdominales (67), diafragma (65), lengua (54), esófago (33) y corazón (26). También se han realizado estudios en caballos como los de Dzilinsky (1960) que informa haber encontrado los parásitos en 132 caballos, localizados en el diafragma, región maxilar, lengua, esófago y corazón.

En la musculatura cardíaca de ganado vacuno que llegaba al matadero, Thils et al. (1960) encontraron 111 casos positivos a Sarcocystis de un total de 203 cabezas de ganado vacuno de 2 años de edad; 2 de 51 vacunos menores de 2 años; ningún positivo de 58 cerdos; 7 de 13 carneros y 4 de 8 antílopes.

Guerrero et al. (1967) estudiaron la prevalencia de Sarcocystis en alpacas y encontraron resultados similares a los de Piekarski (1961), en lo que respecta a la presencia del parásito en el esófago del hospedero; además encontraron que al examen macroscópico el mayor porcentaje de parásitos se encuentran en el cuello (27%) y pierna (26.5%). En nuestras observaciones macroscópicas encontramos que hubo una mayor incidencia de Sarcocystis aucheniae en las regiones correspondientes a la pierna y al esófago y realizando el examen microscópico encontramos que el 98.4% presentaban quistes en el corazón y el 90.08% en el diafragma. No se realizó el estudio microscópico del esófago y pierna por considerar suficiente la presencia de quistes macroscópicos.

Dada la importancia que tienen actualmente los camélidos sudamericanos no sólo como productores de fibra sino también por su aporte en la producción de carne, consideramos importante continuar estudios epidemiológicos y de control a fin de determinar la verdadera incidencia de Sarcocystis aucheniae, cuyo estudio en nuestro país aún se encuentra en sus inicios.

VI.- SUMARIO Y CONCLUSIONES



Para la determinación de anticuerpos específicos de Sarco - cystis aucheniae, en especies de camélidos sudamericanos, con el fin de hallar una prueba de diagnóstico serológico in vivo para esta parasitosis, se examinaron 131 muestras de sueros de llamas (Lama glama), procedentes de la provincia de Puno, aplicando a los sueros la reacción de Fijación del Complemento según la técnica del 50% de hemólisis de Bozicevich modificada por Knierim (1968); la reacción de Hemaglutinación Indirecta por el micrométodo en placa, aplicada y modificada por Knierim (1966) y la prueba de Aglutinación Directa, aplicada y modificada por Arcay (1966) la que no dió ningún resultado por no haberse obtenido el suero inmune en animales de laboratorio. También se realizó el estudio histológico de cada animal tomándose muestras de corazón y diafragma, para corroborar nuestros resultados serológicos.

De ésto se concluye:

1. Que con la prueba de Hemaglutinación Indirecta se obtuvo el 99.2% de positividad en la infección de llamas por Sarcocystis aucheniae.
2. Que con la prueba de Fijación del Complemento se obtuvo el 12.97% de positividad, dado su elevado carácter de anticomplementariedad.
3. Que la prueba de Hemaglutinación Indirecta por su mayor sensibilidad, equivalente a la máxima expresión de positividad, parece ser la prueba indicada para el diagnóstico in vivo de la infección de llamas por Sarcocystis aucheniae.
4. Que existe una correlación directa entre la prueba de Hemaglutinación Indirecta y la presencia del parásito (94%).
5. Que la reacción de Fijación del Complemento no sería la prue

ba de diagnóstico indicada, por su elevado porcentaje de sueros anticomplementarios que no permite la expresión de resultados verdaderos.

6. Que las observaciones macroscópicas de diafragma y músculo cardíaco resultaron negativos, mientras que las observaciones histológicas de ambos órganos dieron el 98.47% de positividad.

VII .- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ANDRADE, C. (1971). Serological studies on the determination of similar antigens in Toxoplasma, Sarcosporidia and Coccidia. Ber. Munch. Tieraerztl Wochenschr 84 (5): 61-64.

ARCAY-DE-PERAZA, Lucila. (1966). The use of Sarcocystis tenella "spores" in a new agglutination test for sarcosporidiosis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 60: 761-765.

BATISTIC, B. (1965). Sarcosporidiosis in animals and man in Bosnia and Hercegovina. Vet. Fak. Univ. Sava jevo. Veterinaria Savaj. 14-15-64.

BROCKLESBY, W. y VIDLER, Brenda. (1965). Some parasites of East African wild animals. East African Vet. Res. Organ, Kenya. Wildlife 3: 120-122.

BRUMPT, E. (1922). Précis de Parasitologie. 3era. ed. Masson y Cia. Editeurs Paris. 1216 p.

CONDORENA, A. y FRANCO, E. (1967). Aspectos sobre la crianza de alpacas en el Departamento de Puno. Bol. Ext. IVITA 2: 72-73.

DA-SILVA, L. (1959). Rapid test for Sarcosporidiosis. Ann Escola Med. Vet. Lisboa. 2: 25-28.

DZILINSKY, E. (1960). Does Sarcosporidiosis in horses occur in Poland? Wiadomosci Parazytol 6 (2/3): 213-220.

EL AFIFI, A.; ABDO, A. y EL SAWAH, H. (1963). Transmission of Sarcocystis blanchardii into white mice. Vet. Med. J. Giza 8(9): 219-223.

FULTON, J. (1965). Studies on agglutination of Toxoplasma gondii. Trans. Roy. Soc. Med. Trop. Hyg. 59(6):694-704.

GOLDSMITH, R.; KAGAN, I.; REYES-GONZALEZ, M. y CEDENO, J. (1971). Estudios seroepidemiológicos realizados en Oaxaca, México. I. Encuesta de anticuerpos parasitarios mediante la prueba de hemaglutinación indirecta. Bol. Ofic. Sanit. Panam. 71(6):500 - 519.

GUERRERO, C. y HERNANDEZ, J. (1967). Ciclo evolutivo del Sarcocystis. Bol. Ext. IVITA 2:70-71.

GUERRERO, C.; HERNANDEZ, J. y ALVA, J. (1967). Sarcocystis en alpacas. Rev. Med. Vet. Lima. 21:69-76.

HENNEPE, E. (1967). Etude cytologique des premiers stades du développement d'une coccidie: Myriosporides amphiglenae. J. Protozol 14 (1):27-39.

HOCKER, K. (1957). Correlation between Toxoplasma dye test result and Sarcosporidiosis in sheep and cattle. Inaug. Diss. Munich pp. 51.

KALLAB, K. (1966). Sarcosporidia in cattle and pigs at the Vienna abattoir. Wientierarozte Mschr. 53:34-39.

KNIERIM, Feliza y SAAVEDRA, Patricia. (1966). Técnica de la reacción de Hemaglutinación aplicada al diagnóstico de la parasitosis. Bol. Chil. Parasitol. 21(2): 39-44.

KNIERIM, Feliza. (1968). Técnica de la reacción de fijación del complemento según el método del 50% de hemólisis de Bozicevich aplicada al diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Bol. Chil.

Parasitol. 13: 75-78.

KNIERIM, Feliza. (1964). El valor de las reacciones serológicas en el diagnóstico de algunas infecciones parasitarias. Bol. Chil. Parasitol. 19(4):119-123.

KOZAR, M. (1971). Microscopic diagnosis of sarcosporidiosis and its incidence in some domestic animals in Poland. Wiad Parazytol. 17:29-39.

LEE, G. y LUNA, H. (1968). Manual of Histologic. Chief Histopathology laboratories Armed Forces Institute of Pathology. 3a. ed. pp 32 -41.

LEVINE, N. (1966). Protozoan parasites of domestic animals and of man. Burgess Publish Co Minnesota. 412p.

LOCKE, L. y KRIUSLEY, J. (1966). Sarcocystis in a Yellowthroat and a rusty blackbird wild life diss ass bull. Patuxent wittli fe Res. Center Laurel, Maryland.

LUDVICK, J. (1960). The electron microscopy of Sarcocystis miescheriana (Kühn, 1865) J. Protozool. 7(2):128-135.

MADRZAK, B. (1966). Variations in the incidence of slaughter pigs with Sarcocystis. Medycine Wet. 22:270.

MANDOUR, A. (1965). Morphological changes shown by Sarcocystis in vitro and in vivo. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 33(3): 359-360.

MANDOUR A. (1964). Pathology and symptology of Sarcocystis infection in man. Proceeding of the first International Congress

of Parasitology. 451-452.

MANDOUR, A. (1970). Sarcocystis infection in African antilopes. Ann. Trop. Med. Parasitol. 64:513-523.

MC MANUS, B. (1963). Incidence of porcine sarcosporidiosis in a abattoir in Thuringen. Angew Parasit. 4:140-150.

MIESCHER, F. (1943). Ueber eigentümliche schläuche, in den muskeln einer Hausmaus. Ber. ü. d. Verhandl. Naturforsch. Gesellsch. Basel 5:198-203.

MONTAÑO, G. y UCROS, H. (1965). Comparación entre las reacciones de hemaglutinación y fijación del complemento en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Bol. Chil. Parasitol. 20(3):62-67.

PIEKARSKII, G. y SAATHOFF, M. (1962). Comparative serological test with Sarcocystis and Toxoplasma antigens on sheep and laboratory animals. Z. Parasitenk. 21:363-380.

PIEKARSKII, G., SCHAFER, E., NIEDERLANDER, R. (1961). Incidence of Sarcocystis tenella in sheep. Z. Parasitenk. 20:479-488.

SEBEK, Z. (1960). Sarcocystis in insectivora and rodents. Zool. Listy. 23(1): 1-6.

SENAUD, J. y PUYTORAC, P. (1962). Observations complémentaires sur l'ultrastructure de la "spore" de Sarcocystis tenella. Compt. Rend. Soc. Biol. 156(10):1630-1633.

SENAUD, J. (1963). Modes of multiplication of cellular elements within sarcosporidial cysts of sheep. Acad. Sci., Paris 256:1009-1011.



SIMPSON, C. (1966). Electron microscopy of Sarcocystis fusiformis Dep. Vet. Sci. Univ. Florida Gainesville, J. Parasitol 52:607 - 613.

SOMINISKII, Z. (1971). Pathological-morphological changes during experimental sarcocystiosis in chickens. Vet. Moscú 6:68-69.

SPINDLER, A., y ZIMMERMAN, E., Jr. (1945). The biological status of Sarcocystis. J. Parasitol. 31:dec. Suppl p. 13.

THIJS, E., FAGARD, P. (1960). Considerations sur la sarcosporidiose au Katanga (Congo Belge). Bull. Soc. Path. Exot. 53(1):106-110.

VALLENAS, P. (1970). Comentarios sobre la posición taxonómica de los camélidos sudamericanos en la sistemática. Bol. Ext. IVITA 4:128-141.

WERNER, F. (1966). A Sarcocystis infection with pathological changes in Chamaeleo fischeri by Sarcocystis chamaeleonis. Z. Parasitenk 27(4):317-335.

WETTIMUNY, S. y ABEYSENS, F. (1966). Sarcosporidiosis in slaughtered neat cattle and buffaloes in Ceylon. Ceylon Vet. J. 14, 2-6.

ZEVE, V., PRICE, D. y HERMAN, C. (1966). Electron microscope study of Sarcocystis sp. Exp. Parasitology 18(3):338-346.